

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**Estudo do polimorfismo genético de espécies do gênero *Aniba*
(Lauraceae) utilizando marcadores ISSRs**

DENISE CORRÊA BENZAQUEM

MANAUS- AM

DENISE CORRÊA BENZAQUEM

**Estudo do polimorfismo genético de espécies do gênero *Aniba*
(Lauraceae) utilizando marcadores ISSRs**

Dissertação apresentada a Universidade do Estado do Amazonas como parte da exigência do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio

Manaus
Amazonas-Brasil
2009

Dedico a todos que direta
e indiretamente contribuíram
para realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço, infinitamente a Deus, pela saúde, pela excelente família e amigos que tive a felicidade de encontrar nessa jornada.

Aos meus pais Estônio e Nazaré e minha irmã Deise, pelo apoio e incentivo constantes em minha vida, sem eles jamais chegaria aonde cheguei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT) da Universidade do Estado do Amazonas, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Ademir Castro e Silva, que à frente da Coordenação da Pós-Graduação colaborou sempre atenciosamente para a realização deste curso.

Ao Prof^o. Dr, Paulo de Tarso Barbosa Sampaio pela orientação, pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho.

Agradecimento especial ao Prof^o Danival Vieira de Freitas com quem tive a grande oportunidade de trabalhar, pela preciosa orientação, paciência, amizade, incentivo, parceria e, sobretudo por compartilhar com muita humildade todo o seu conhecimento, que contribuíram muito pra meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Serrão Contim, pelo apoio, incentivo e sugestões no início desse trabalho e por ter me acolhido em seu laboratório sem reservas.

Á Dra. Eliana Feldberg por todo apoio durante a minha formação profissional e pelo seu exemplo de determinação.

Aos meus colegas de turma, Maria José, João Paulo, Edilene Cristina, Rebecca pela amizade, convívio, por compartilhar momentos alegres e conhecimentos que contribuíram muito para o nosso crescimento pessoal e profissional.

Á amiga Ydrielly, pela amizade, e pela imensa colaboração no laboratório (bancada, fotografia e informática) sempre dispensada com dedicação e paciência.

Ao Valdir e Marizete casal maravilhoso que financiaram uma parte fundamental do trabalho.

Aos amigos do Laboratório Sayara, Grace, Jorlana, Josimara, Maxwell, Eliane pela amizade e colaboração dispensadas durante a realização desse trabalho.

Á querida Patrícia, pela amizade, pela ajuda na coleta das amostras.

Á Fundação de Amparo a Pesquisa do estado do Amazonas –FAPEAM, pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

“Neste momento a natureza
sozinha já tem dificuldade em se
poder equilibrar, mas juntos ainda
a poderemos recuperar.”

Rui Pais

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Objetivo Geral.....	2
2.1. Objetivos específicos.....	2
3. Revisão Bibliográfica.....	3
3.1. O gênero <i>Aniba</i>	3
3.2. Variabilidade genética em populações vegetais naturais.....	6
3.3. Marcadores moleculares: tipos, importância e aplicações	7
3.4. Utilização de Marcadores Moleculares ISSR para caracterização genética de espécies vegetais.....	10
4 Metodologia.....	12
4.1. Origem do material vegetal.....	12
4.2. Coleta do material vegetal.....	12
4.3. Extração do DNA genômico.....	13
4.4. Quantificação do DNA.....	15
4.5. Seleção de <i>primers</i> e amplificação dos ISSRs.....	15
4.6. Análise dos dados.....	16
4.7. Diversidade e estrutura genética.....	17
5. Resultados e Discussão	17
5.1. Extração do DNA	17
5.2. Amplificação do DNA.....	19
5.3. Polimorfismo genético.....	22
5.4. Diversidade genética.....	24
5.5. Análise da matriz de similaridade.....	27
6. Conclusões.....	31
7. Referencias Bibliográficas.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- <i>Primers</i> de ISSRs utilizados nesse estudo, suas temperaturas de anelamento e número de pares de bases.	20
Tabela 2- Numero total de bandas e porcentagem de locos polimórficos entre as espécies do gênero <i>Aniba</i> analisadas.....	23
Tabela 3- Estimativas diversidade genéticas das espécies do gênero <i>Aniba</i>	26
Tabela 4- Estimativa da distância genética de Nei, (1978).....	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mapa indicando os locais da coleta (▲). Modificado de Ohashi,1999.....13
- Figura 2. Visualização das bandas de DNA extraído de 5 indivíduos adultos de *Aniba rosaeodora* em gel de agarose 1%.....19
- Figura 3. Padrão de fragmentos gerados pelo marcador ISSR 32, em amostras de DNA de (a) *A. canellila*, (b) *A. paviflora* e (c) *A. rosaeodora* De 1 a 10 = amostras e M = marcador Ladder 100pb).....21
- Figura 4. Perfil eletroforético de marcadores ISSR em três espécies de *Aniba*. Amostras 1 –*Aniba rosaeodora*, 2- *Aniba canellila* e 3 – *Aniba paviflora*24
- Figura 5. Dendograma das espécies analisadas: 1- *A. rosaeodora* (Manaus), 2- *A.canellila*, 3- *A. paviflora*.....29
- Figura 6. Dendrograma de similaridade genética entre as espécies de *Aniba*, baseado no Coeficiente de Jaccard, mostrando a formação dos grupos.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Análise de Variância Molecular
CTAB	Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ethylenediaminelelacetate
SCAR	Sequence Characterized Amplified Regions
SSR	Simple Sequence Repeat
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
ng	Nanograma
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidone
pb	Pare de bases
RAPD	Random amplified polymorphism DNA
SSR	Simple sequence repeat
TBE	Tris-Borato-EDTA
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average

RESUMO

A família Lauraceae é conhecida por apresentar espécies de grande importância econômica, seja pelo uso da madeira ou emprego na culinária, na medicina popular, entre outros. O uso de plantas aromáticas com propriedades farmacológicas é bastante difundido, em função das atividades antifúngica, repelente, antiinflamatória, anticolinesterásica, analgésica, entre outras, encontradas em seus óleos voláteis. O gênero *Aniba* é um dos que mais se destaca por apresentar espécies aromáticas de alto valor comercial, no entanto muito de suas espécies tem sido comercializada erroneamente pela dificuldade de sua identificação. Neste trabalho, os marcadores Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) foram utilizados para acessar a diversidade genética e filogenia de *A. roseodora*, *A. canelilla* e *A. paviflora*. Os tecidos de 57 acessos foram obtidos de dois locais Reserva florestal Adolfo Lisboa Ducke em Manaus e Maués. Foram testados 30 *primers* aleatórios, sendo selecionados sete, que geraram um total de 321 fragmentos amplificados, destes 227 foram polimórficos (86.29%). O número de alelos observados e o índice de Shannon variaram de 1.3271 a 1.450 e de 0.0931 a 0.0805 respectivamente. A análise de agrupamento (UPGMA) foi realizada para o conjunto de dados ISSR. Os resultados ilustram as relações genéticas entre as três espécies do gênero *Aniba*. A menor distância genética encontrada foi de 0,1041 entre as populações de *A. roseodora* e *A. paviflora*. Portanto, as espécies *A. roseodora* e *A. paviflora* apresentam um maior grau de relacionamento genético. Estes resultados adicionam novas informações sobre a diversidade genética em espécies do gênero *Aniba*, conseqüentemente contribuindo para o conhecimento biológico desta espécie e fornecendo subsídios para futuros programas de melhoramento genético e para programas de conservação dessas espécies.

Palavras chave: Diversidade Genética, Marcadores Moleculares ISSR e *Aniba*.

ABSTRACT

The Lauraceae family is known to have species of great economic importance, either by its wood or for its use in cooking, in folk medicine, among others. The use of aromatical herbs with pharmacological properties is quite widespread, because of known effects like antifungal activity, insect repellent, antiinflammatory, anticholinesterase activities, analgesic, among others, is found in volatile oils. The genus *Aniba* is one that stands out by having more aromatic species of high commercial value, however much of its species has been falsely marketed by the difficulty of their identification. In this work, inter Simple Sequence repeats (ISSR) markers were used to assess the genetic variability and phylogeny of *A. rosaeodora*, *A. canelilla* and *A. parviflora*. Vegetative tissues of 57 accessions were obtained from two locations in Reserva florestal Adolfo Lisboa Ducke in Manaus and Maués. They are tested 30 aleatory primers and selected seven, that generated 321 amplified fragments, from those 227 showed polymorphism (86.29%). The number of observed alleles and index Shannon ranged from 1.3271 to 1.450 and 0.0931 to 0.0805 respectively. Cluster analyses (UPGMA) were performed from ISSR data set. The results illustrate the genetic relationship among the three species of the genus *Aniba*. The smallest genetic distance of 0.1041 was found between populations of *A. roseadora* and *A. parviflora*. Therefore, the species *A. roseadora* and *A. parviflora* present a greater degree of genetic relationship. These results add new information regarding the genetic diversity in species of the genus *Aniba*, thus contributing towards the biological knowledge of this species, and providing with subsidies for future breeding and conservation program.

Keys Word: Genetic diversity, Molecular markers, ISSR and *Aniba*

1. Introdução

A família Lauraceae é composta por árvores ou arbustos dióicos ou monóicos com folhas alternas, raramente opostas, sem a presença de estípulas. A inflorescência geralmente é axilar e flores em geral pequenas unissexuadas, bissexuadas ou polígamas com fruto bacáceo ou nucóide, de semente única com ou sem cúpula. Composta por 50 gêneros e cerca de 2.500 espécies, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que no Brasil ocorrem 22 gêneros e 390 espécies. Dentre eles o gênero *Aniba* destaca-se por apresentar muitas espécies aromáticas, de onde são extraídos óleos voláteis de grande importância, na indústria farmacêutica e de perfumes, obtidos a partir de *Aniba rosaeodora*, que tem como constituinte majoritário o álcool terpenico linalol.

Desde o início do século passado, as espécies deste gênero vem sendo usadas de modo não sustentável e em larga escala, levando o IBAMA a incluí-las na lista de espécies em perigo de extinção. Algumas ações têm contribuído para a falta de sustentabilidade da cadeia produtiva deste óleo, a começar pela retirada indiscriminada de árvores que vem reduzindo de forma drástica as populações naturais, em muitas áreas da Amazônia.

A redução drástica no tamanho das populações através do corte seletivo, pode levar a deriva genética, caracterizada pela perda e fixação aleatória de alelos e ao aumento da endogamia e do parentesco dentro das populações. A deriva genética pode inviabilizar os programas de manejo, pela redução da capacidade adaptativa, reprodutiva e produtiva das espécies. As alterações na distribuição espacial dos indivíduos dentro das populações também podem levar às mudanças na densidade e no comportamento dos polinizadores, gerando alterações nos níveis de cruzamento, como o

aumento da autofecundação e conseqüentemente, a endogamia. Dessa forma, é de suma importância conhecer melhor as espécies da região por meio de estudos de diversidade genética, estrutura genética populacional e caracterização fenotípica de caracteres de interesse econômico, entre outros. Uma alternativa tecnológica é a utilização de ferramentas da biotecnologia que permitem, por exemplo, conhecer a variabilidade genética das espécies. Dentre essas, destaca-se os marcadores moleculares, ISSR (*Inter Simple Sequence repeat*), que são tecnicamente acessíveis, gerando um grande número de marcadores polimórficos.

Diante disso, estudar as espécies do gênero *Aniba* (*Aniba rosaeodora*, *Aniba canellila* e *Aniba parviflora*) quanto à variabilidade genética, faz-se necessário, pois estas possuem um valor importante para a região. O conhecimento das espécies constituirá numa relevante forma de contribuição para que sejam traçadas estratégias adequadas de conservação e melhoramento dessas espécies.

2. Objetivo Geral

Investigar a similaridade genética entre três espécies do gênero *Aniba*, presentes na reserva Florestal Adolfo Lisboa Ducke, a partir de marcadores moleculares ISSR.

2.1. Objetivos específicos

1. Elaborar um protocolo eficaz para extração de DNA de *Aniba rosaeodora*, *Aniba canellila* e *Aniba parviflora*, em quantidade e qualidade adequada para realização de PCR.

2. Selecionar marcadores de ISSR para o estudo de diversidade genética no gênero *Aniba*;
3. Inferir sobre a similaridade genética entre: *Aniba rosaeodora*, *Aniba canellila* e *Aniba parviflora*;
4. Desenvolver protocolos de identificação molecular para a espécie *A. rosaeodora*.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. O gênero *Aniba*

O gênero *Aniba* pertence a família Lauraceae, suas espécies destacam-se pelo alto valor econômico, devido a constituição do óleo essencial, encontrado em grande quantidade, principalmente, no lenho e na casca. É constituído por 41 espécies neotropicais (MABBERLEY, 1990). E a fitoquímica de 18 destas espécies é suficientemente conhecida para permitir a classificação sistemática baseada em compostos secundários (GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981). Podem ser divididas em três grupos, de acordo com a natureza química do constituinte predominante no óleo essencial: o grupo do linalol (*A. roseodora*, *A. duckei*); o grupo do benzoato (*A. fragans*, *A. firmula*, *A. gardneri* (Meiss.) Mez, *A. burchelli* Kosterm, *A. parviflora*, *A. permolis* (Nees) Mez, *A. guianensis* Aubl.) e o grupo do alibenzeno (*A. canellila*, *A. hostmanniana* (Nees) Mez, *A. pseudocoto* (Reesby) Kosterm) (MORAES *et al.*, 1972; GOTTLIEB *et al.*, 1981). A espécie *A. burchelli* apresenta, além do benzoato de benzila, alto teor de alibenzenos e até um propenilbenzeno (ALVARENGA *et al.*, 1977). Cabe ressaltar que o Benzoato de benzila foi anteriormente localizado em *C. zeylanicum* (GOTTLIEB, 1972) e *O. teleiandra* (NAVES *et al.*, 1961).

Desde o início do século passado, o óleo essencial, principalmente, de *Aniba rosaeodora* Ducke, tem sido usado de modo não sustentável e em larga escala, para a produção de linalol e fragrâncias para a indústria de perfumaria, levando o IBAMA a incluí-lo na lista de espécies em perigo de extinção (ALENCAR & FERNANDES 1978; CLAY *et al.*, 1999).

O Pau-rosa é uma espécie nativa da região amazônica, seu óleo essencial é volátil e de grande interesse econômico, tradicionalmente, extraído da madeira e amplamente utilizado pelas indústrias de perfumaria e cosméticos. A derrubada sistemática da árvore da floresta nativa tem conduzido à diminuição acentuada do número de indivíduos nas populações naturais (MAY & BARATA, 2004). Estudos comprovaram que outras espécies de lauráceas têm sido coletadas em lugar de *A. rosaeodora*, propositadamente, ou por acidente, pois a identificação botânica desta espécie é difícil, devido sua forte semelhança com outras espécies do gênero, como *A. parviflora* (Louro-rosa). Amostras extraídas de populações distintas demonstraram uma gama de variedades de aromas obtido pela extração do óleo, sugerindo variação genética da matéria-prima ou adulteração do óleo com outras espécies de *Aniba*. Diversas fontes sugerem que outras espécies do gênero *Aniba* estão sendo usadas pela indústria para “incrementar” a venda de óleo essencial, produzindo óleo de pau-rosa de qualidade inferior, mas isso não seria tão vendável quanto o óleo de pau-rosa puro (MAY & BARATA, 2004). Os autores relatam também a existência de três tipos de variedades de “pau-rosa” os chamados Ecótipos, e essa classificação baseia-se na coloração do lenho: “pau-rosa mulatinho”, que é mais escuro, de densidade elevada, e que submerge quando as toras são cortadas e atiradas na água; “pau-rosa itaúba”, de cor amarelada, menos denso, e “pau-rosa imbaúba”, muito leve e quase branca. O primeiro é mais rico em essência e o último, mais pobre.

Portanto, faz-se necessária a realização de estudos para caracterização genética entre as espécies deste gênero, para que fique assegurada a identidade e integridade do óleo de pau-rosa, bem como, o desenvolvimento de protocolos de identificação com a utilização de marcadores moleculares, que possam auxiliar a identificação para posteriores coletas, estruturação de plantios bem como, no melhoramento genético das espécies.

Outras espécies, como *A. canelilla* e *A. parviflora* popularmente conhecidas como Preciosa e Louro-rosa respectivamente, também são usadas na perfumaria. Porém, esta última, é de ocorrência muito rara, o que restringe sua exploração. Dentre as espécies de uso medicinal está a *Aniba canelilla*, cujo óleo é utilizado na indústria de cosmético e perfumaria. Na região Amazônica, a infusão da casca da Preciosa tem sido utilizada para o tratamento de diarreia, peitoral, antiespasmódico e estimulante do sistema nervoso (CORRÊA, 1984; Martins, 1989). O uso principal da preciosa é a extração do óleo a partir da madeira, galhos e folhas (ALMEIDA, 1993; LIMA *et al.*, 2004). Análise do conteúdo do óleo destilado de indivíduos adultos apresentou 71,2% de nitrofeniletano (folhas) e 68,2% nos galhos finos (LIMA *et al.*, 2004). *Aniba parviflora* também é amplamente utilizada na medicina, o óleo da semente tem aplicação em veterinária como vermífugo, e usa-se a madeira em construções e marcenaria (MARQUES, 2001, WANDERLEY *et al.*, 2003).

Apesar da grande importância econômica do gênero *Aniba* para a região são poucos os estudos genéticos realizados neste gênero. Contim *et al.*, (2005) apresentaram informações sobre o tamanho do genoma (2,36 picogramas de DNA) e revelaram a estrutura cariotípica (24 cromossomos). Santos *et al.* (2007) fizeram estudos com a aplicação de marcadores moleculares para determinação da diversidade genética em populações, onde segundo os autores foi possível detectar um padrão de estruturação

“em cline” das populações por eles analisadas, devido a interação de fluxo gênico e distância geográfica. Outros estudos foram relacionados à filogeografia e filogenia para a família Lauraceae, incluindo espécies do gênero *Aniba* (ROHWER, 2000; CHANDERBALI *et al.*, 2004).

3.2. Variabilidade genética em populações vegetais naturais

A variabilidade genética é a condição principal para a evolução, sendo sua amplitude e distribuição de interesse fundamental para o conhecimento do potencial para as mudanças evolutivas e a existência da capacidade adaptativa das espécies de plantas e suas populações. A diversidade genética pode ser mensurada em vários níveis, como as diferenças entre espécies, diferenças entre populações da mesma espécie, diferenças entre partes da mesma população e diferenças entre indivíduos nas populações (SILVERTOWN & DOUST, 1993; ZUCCHI *et al.*, 2005; CONTE *et al.*, 2008).

As populações com pequena variabilidade genética estão em maior risco de extinção do que aquelas populações com maior variabilidade genética (O'BRIEN & EVERMANN, 1988). A perda da variabilidade genética é o tópico central da conservação genética. Os conservacionistas acrescentam que o declínio na variação genética pode inibir no futuro a adaptação do organismo às mudanças ambientais e conseqüentemente limitar seu potencial evolucionário, podendo levar essas populações a um possível risco de extinção (AVISE, 1994; EIRA *et al.*, 2004).

Os resultados de quantificação da variabilidade genética podem sofrer influência da metodologia empregada. O uso de marcadores isoenzimáticos fornecem melhor a caracterização fenotípica das espécies, enquanto as técnicas que utilizam marcadores

moleculares em nível do DNA, dão uma melhor caracterização genotípica (WESING *et al.*, 2004; ZUCCHI *et al.*, 2005). O conhecimento dos padrões de distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações naturais garante o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas e eficientes para a aplicação de técnicas de manejo nas florestas e para o estabelecimento de ações de conservação *in situ* (FRANKEL; BROWN & BURDON, 1998; KAGEYAMA *et al.*, 2003; CAVALLARI *et al.*, 2006).

Os marcadores genéticos são a principal ferramenta para descrever os padrões da variabilidade genética de uma população natural, possibilitando avaliar a variabilidade intra e interpopulações (TELLES, 2000; SEBBENN, 2002).

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações está relacionada com fatores intrínsecos à espécie, como o mecanismo de dispersão de pólen e sementes, o sistema reprodutivo e cruzamentos, além dos fatores ambientais que possam influenciar ou direcioná-la. Os parâmetros, como o número de alelos por loco, a porcentagem de locos polimórficos, a heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação, são usados na caracterização da variabilidade genética intrapopulacional (PINTO; SOUZA & CARVALHO, 2004; GUSSON *et al.*, 2005).

3.3. Marcadores moleculares: tipos, importância e aplicações

Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas e cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo (e qual sua sequência a função). Esses marcadores mostram-se muito sensíveis à detecção do polimorfismo, visto que as diferenças entre as sequências nucleotídicas de cada indivíduo, revelam uma “impressão digital” genética. Os tipos de marcadores

disponíveis diferenciam-se pela sua tecnologia utilizada, pela habilidade de detectar diferença entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência, repetibilidade, quantidade exigida de material biológico, tipo de segregação (dominante e co - dominante), entre outros (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994).

Segundo Ferreira & Gratapaglia (1998) marcadores moleculares apresentam uma série de vantagens em relação aos marcadores morfológicos, tais como: (I) possibilidade de detecção de um número praticamente ilimitado de marcas moleculares (II) ausência de variação por causa do ciclo de vida da planta (III) e não influência das condições ambientais.

O primeiro marcador molecular, baseado no DNA, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi desenvolvido na década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição. Em meados de 80, com o advento das técnicas de biologia molecular, principalmente, a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), novas classes de marcadores foram desenvolvidas, destacando-se, entre elas: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e Microsatélites (SSR-*Simple Sequence Repeats*; ISSR-*Inter- Simple Sequence Repeats*) (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

Atualmente, os distintos marcadores disponíveis constituem importantes ferramentas para vários estudos, tais como, diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas, mapeamento genético, identificação e clonagem de genes, filogenia, estudos de evolução, melhoramento, criação de novas variedades, biologia populacional e conservação de espécies (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998; CAIXETA *et al.*, 2006). Tanto na conservação como no melhoramento genético de recursos genéticos é importante o conhecimento da estrutura

genética das espécies naturais, bem como de seus sistemas reprodutivos, a fim de se determinar as áreas mais importantes para conservação.

Os marcadores moleculares também são amplamente utilizados em estudo de filogenias moleculares e cladística para acessar o conhecimento das relações evolutivas entre as espécies (MARCATO & PIRANI, 2005; JARDIM DE VARGAS *et al.*, 2006). Esta área do conhecimento tem crescido amplamente desde 1990, devido ao descobrimento de métodos mais rigorosos de construção de árvores filogenéticas, combinado com a explosão de informações de sequências de DNA. De fato, a análise das sequências de DNA permite elaborar relações de ancestralidade e descendência e reconstruir a sequência evolutiva mais plausível para um conjunto de organismos. Isto é possível porque os processos de análise e representação filogenética tem por base o conceito da árvore, que consiste essencialmente num conjunto de ramos, sendo os terminais correspondentes às diferentes unidades taxonômicas estudadas, e de nós, correspondentes a hipotéticas formas ancestrais (NEI & NARUYA, 1987).

Com o desenvolvimento de técnicas e reagentes para sequenciamento automatizado, o uso da informação contida no DNA de certos fragmentos tornou-se viável para estudos envolvendo maior número de táxons. Diferentes fragmentos de DNA têm sido utilizados como fonte de caracteres para análise filogenética, sendo os espaçadores e/ou íntrons os fragmentos ideais para estudo infragenético, pois acumulam mutações mais rapidamente do que regiões codificantes, graças a pressões de seleção mais baixas atuando sobre eles. Assim essas regiões ficam mais livres para variar, fornecendo informações filogenéticas suficientes para evidenciar eventos evolutivos (MATIOLI, 2001).

3.4. Utilização de marcadores ISSR para caracterização genética de espécies vegetais.

Para melhor entendimento da variabilidade genética, e principalmente, da sua importância, é necessário que se conheça a constituição genética da população em estudo. Uma das técnicas que vem sendo amplamente utilizada para estudos de variabilidade genética é o ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) que foi proposta pela primeira vez por Zietkiewicz *et al* (1994). O ISSR é um método baseado na amplificação de DNA por meio de PCR, que envolve a amplificação de fragmentos de DNA presentes em uma distância amplificável entre dois SSRs ou Microsatélites idênticos repetidos em orientação oposta (REDDY *et al.*, 2002). O protocolo de ISSR utiliza um único “*primer*” complementar à sequência SSR, podendo ser não ancorado (GUPTA *et al.*, 1994; WU *et al.*, 1994) ou mais usualmente, ancorado na extremidade 5’ ou 3’ com 1 ou 4 pares de bases degeneradas, que são utilizadas para prevenir o deslizamento da polimerase durante a amplificação, tornando o anelamento entre os “*primers*” e a extremidade do microsatélite, mais específica e reproduzível (ZIETKIEWCZ *et al.*, 1994; BARTH *et al.*, 2002).

A técnica do ISSR permite, portanto, a detecção de polimorfismo em *locus* localizados entre os microsatélites, utilizando sequências simples repetidas (SSRs) como “*primers*” (ZIETKIEWCZ *et al.*, 1994; WU *et al.*, 1994). A mudança na taxa evolutiva dentro dos microsatélites é considerada maior que em outras regiões do DNA. Conseqüentemente, a probabilidade de polimorfismo dessas sequências é maior. A detecção do polimorfismo via ISSR é realizada a partir da visualização de bandas de diferentes tamanhos em gel, de agarose ou poliacrilamida, sendo que cada banda corresponde a uma sequência de DNA delimitada por dois microsatélites invertidos. A

interpretação dos dados é realizada de forma simples: bandas em comum entre genótipos representam similaridade genética, ao passo que, bandas sem correspondentes representam diferenças genéticas (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

A utilização do ISSR tem sido amplamente difundida por se tratar de uma técnica rápida e de fácil manuseio, que superou a maioria das limitações dos outros marcadores, combinando em sua maioria, vantagens do SSR e AFLP, tais como: a não necessidade de conhecimento prévio sobre a sequência de DNA como nos SSRs; baixo custo da técnica quando se comparado com o AFLP; alto grau de polimorfismo; uso de pequenas quantidades de DNA por reação (5 a 20ng); sem comentar a universalidade do RAPD. Os ISSRs apresentam melhor reprodutibilidade das bandas quando comparado ao RAPD, devido ao uso de “*primers*” longos, de 16-25pb de comprimento, os quais suportam temperaturas de anelamento mais altas, resultando em condições de elevadas estringências (REDDY *et al.*, 2002).

A principal desvantagem dos ISSRs está relacionada ao fato de apresentarem, predominantemente, segregação dominante, não sendo tão informativos quanto os SSRs, por exemplo, (GUPTA *et al.*, 1994; RATNAPARKHE *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1998), não podendo distinguir os heterozigotos de homozigotos.

Esses marcadores vêm sendo utilizados desde a década de 1990 como fontes de polimorfismo na identificação de genótipo, confecção de mapas genéticos, seleção e conservação de germoplasma, biologia evolutiva, *fingerprint* genômico, reconstrução filogenética, seleção assistida por marcadores (GUPT *et al.*, 1994; HUSSAIN *et al.*, 2000; MARTIM & SANCHEZ-YELAMO, 2000; BORNET & BRANCHARD, 2004).

Entretanto, em plantas, os ISSRs têm sido amplamente empregados em pesquisas sobre diversidade genética de populações, na estimativa da variação genética dentro e entre populações, espécies ou táxons; e também em estudos de filogenia, como

relatado em trabalhos com arroz (HUANG & SUN, 2000) e plantas ameaçadas de extinção (RAMP *et al.*, 2006).

4. Metodologia

4.1. Origem do material vegetal

Neste estudo foram coletadas três espécies do gênero *Aniba*: *A. rosaeodora*, *A. canellila* e *A. parviflora* amostradas em áreas de ocorrência natural em Manaus (reserva Adolfo Lisboa Ducke) (3°22'30''S e 57°37'30''W) (Figura 1). Em seguida foram depositadas no banco de DNA do Laboratório de Biotecnologia Vegetal situado na UNINILTON LINS – Manaus (Amazonas).

4.2. Coleta do material vegetal

Inicialmente foram amostradas folhas de 19 árvores de cada espécie. O material vegetal (folhas jovens) de cada árvore foi colhido, seco com papel absorvente, colocado num saco de plástico *zip* com sílica gel azul grossa segundo Chase & Hills, (1991) e armazenado num recipiente hermético para se manter fresco durante o transporte até ao laboratório. Em seguida, foi armazenado a -20 °C, onde foi mantido até o momento da extração de DNA.

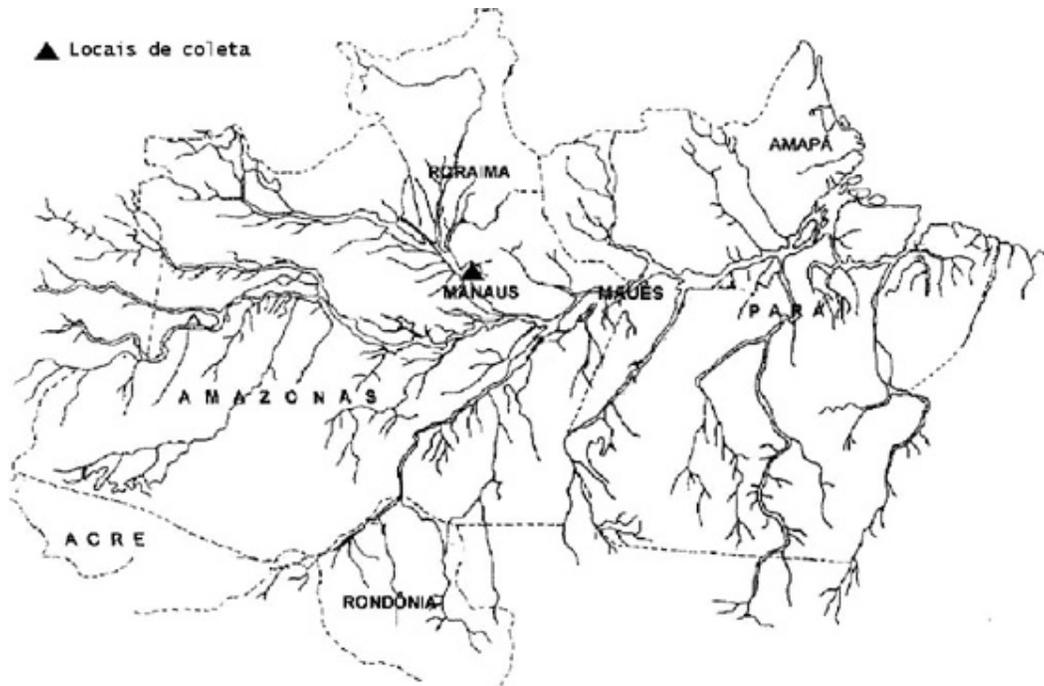


Figura 1. Mapa indicando os locais da coleta (▲).

4.3. Extração de DNA genômico

A extração de DNA das folhas foi realizada com base no protocolo originariamente descrito por DOYLE & DOYLE (1987), com algumas modificações sugeridas por Ferreira & Grattapaglia (1995) e outras estabelecidas no próprio laboratório, como a adição de 10 mg/mL de Proteinase K no tampão de extração e 0,4g de PVP (*polyvinylpyrrolidone*) no momento da maceração. Neste protocolo utilizou-se o detergente catiônico CTAB (*cationic hexadecyl trimetyl ammonium bromide*) com a seguinte composição: 100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA (*ethylenediaminetetraacetate*), 1% de PVP e 2% de *B*-mercaptoetanol.

Após a extração, o DNA estoque foi armazenado em *freezer* à -20 °C e o DNA diluído utilizado foi mantido em geladeira.

O processo de extração consistiu em:

Na etapa inicial da extração, cerca de 50g de folhas foram trituradas em graal de porcelana, após os mesmos permanecerem a -80 °C por aproximadamente 20 minutos, sendo o pó resultante transferido para tubos “ependorf” com 2 mL de capacidade. Para cada tubo foram acrescentados 900 µL de tampão de extração CTAB. A mistura foi agitada vagarosamente em agitador tipo vórtex por 30 segundos. A seguir, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C, por 30 minutos, sendo agitada por inversão a cada 10 minutos. Após a incubação, foram acrescentados 700 µl clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v:v), com subsequente agitação, suavemente, até se formar uma emulsão. A separação das duas fases orgânicas e aquosas foi realizada por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo, para o qual foi adicionado 400 µL (2/3 do volume pipetado anteriormente) de Isopropanol frio para a precipitação dos ácidos nucleicos. O material foi incubado por uma hora a -20°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 75.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% e uma última vez com 1 mL de etanol 100%. Após as lavagens, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão em 50 µl de tampão TE, pH 8,0 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA), seguindo-se de um tratamento com RNase, na concentração final de 100 µg/1ml por 40 minutos a 37 °C. O material foi armazenado em *freezer* a -20°C.

4.4. Quantificação do DNA

A integridade e quantificação do DNA foram determinadas por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,2 µl de brometo de etídio (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A estimativa da quantidade de DNA foi realizada comparando-se 1µl de DNA amostral com padrões do marcador de concentração do fago Lambda (λ). Para essa comparação foram aplicados no gel, juntamente com 1µl de DNA, 2µl de tampão Loading e 3µl de água deionizada para cada amostra. As amostras foram submetidas a eletroforese em minicubas horizontais, contendo tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) por aproximadamente 20 minutos a 80 volts.

Após 20 minutos de corrida eletroforética, o DNA foi observado em um transiluminador de ultra-violeta e a imagem foi fotografada com máquina digital Sony (DSC-H2). Para a reação de PCR-ISSR, as amostras foram diluídas para concentração final 25 ng/µl.

4.5. Seleção de *primers* e amplificação via PCR dos ISSRs

Para detecção de polimorfismo entre as espécies analisadas, foram selecionados sete *primers* (Tabela 1) de um conjunto de 28 *primers* citados na literatura. Foram considerados fragmentos amplificados com tamanho variando de 180 pb a 1600 pb. As condições de amplificação de DNA foram conduzidas em termociclador Endurance Techene TC-512, com o DNA genômico das espécies de *Aniba* como *template*, os *primer* citados a cima e pré- mix *GoTaq*[®] *Green Master Mix*, segundo orientações do fabricante.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 μ l contendo os seguintes reagentes: 2 μ l de DNA, 1 μ l de “primer”, 2 μ l de água deionizada e 5 μ l de GoTaq® Green Master Mix. As reações de PCR foram conduzidas como se segue: 4 min a 94°C, seguido de 30 ciclos com 45 seg. de desnaturação a 94 °C, 45 seg. de anelamento a 55 – 62 °C (dependendo do par de *primer*), 1 a 4 min de extensão a 72 °C (dependendo do tamanho do fragmento a ser amplificado) e 10 min de extensão final a 72 °C.

Os produtos amplificados foram separados em gel de eletroforese 1,5% em tampão TBE, com tensão constante de 110V por quatro horas. Em seguida os fragmentos amplificados foram observados em um transiluminador de ultra-violeta e a imagem foi fotografada com máquina digital, o tamanho dos fragmentos pode ser estimado pela comparação das bandas migradas no gel com o marcador molecular de peso Ladder 100 pb.

4.6. Análise dos dados.

Para análise dos dados de ISSR, os perfis das bandas obtidas foram convertidos em uma matriz binária de presença (1) e ausência (0) de bandas. Foram excluídas das análises bandas que apresentaram baixa repetibilidade e/ou intensidade e também as bandas apresentaram a mesma mobilidade e mesmo peso molecular para todas as amostras, conhecidas como bandas monomórficas. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foi verificado por meio de padrão de peso molecular (100pb DNA Ladder). Nas análises foram considerados fragmentos de DNA de tamanho 170 a 1600 pares de bases. A matriz de dados binários foi utilizada para avaliar o nível de polimorfismo referente às espécies. Cada fragmento foi considerado como um loco.

4.7. Diversidade genética

As análises da diversidade genética foram efetuadas pelo programa POPGENE versão 1.32 (*Population Genetic Analysis*) (YEH *et al.*, 1997), utilizando parâmetros para dados diplóides dominantes, ou seja, assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg entre as populações. Foram estimados o número de alelos observados (n_a), o número efetivo de alelos (n_e) (KIMURA & CROW, 1964), a porcentagem de locos polimórficos (utilizando-se o critério de 99%), e o índice de Shannon (I) (LEWONTIN, 1972).

As similaridades genéticas entre as populações (Nei, 1978), estimadas no programa FTPGA, versão 1.3 (*Tools for Population genetic Analysis*) (MILLER, 1997), foram utilizadas para a construção do dendrograma, por meio do método UPGMA (*Unweighted pair group method arithmetic average*) (DIAS, 1998), empregando o índice de Jaccard.

5. Resultados e Discussão

5.1. Extração de DNA

Foi extraído o DNA de 57 indivíduos coletados pertencentes a três espécies do gênero *Aniba* (*Aniba rosaedora*, *Aniba canellila*, *Aniba parviflora*), selecionadas para este estudo, sendo o número amostral por espécie igual a 19 indivíduos. Os ácidos nucléicos foram obtidos pelo método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987), com algumas modificações, como a adição de PVP (*Polyvinylpyrrolidone*) no momento da maceração

e a adição de 10 mg/ml de proteinase K no tampão de extração, que permitiu a completa inibição da oxidação fenólica no macerado em função do elevado teor de polissacarídeos, permitindo a purificação de DNA genômico com boa qualidade e em quantidade satisfatória (Figura 2). A integridade e qualidade do DNA foram confirmadas com o uso de espectrofotometria - NANODROP. Santos *et al* (2007) obtiveram DNA de *A. rosaeodora* (pau-rosa) utilizando o método CTAB, como descrito originalmente, para utilização das amostras em reações de amplificação por PCR em análise de RAPD (*Random Amplification Polymorphic DNA*), mas também observaram a ocorrência de oxidação fenólica em parte das amostras. A adição de PVP parece ter tido efeito aditivo na prevenção da oxidação dos ácidos nucleicos das espécies estudadas (KIM *et al.*, 1997). Muitos autores têm descrito modificações no protocolo original de extração de DNA por CBTA, ajustando sua metodologia a condições especiais, (PADMALATHA & PRASAD, 2006; PALOMERA-AVALOS *et al.*, 2008). O protocolo de extração de DNA apresentado neste trabalho pode servir de referência para extração de ácidos nucleicos de outras espécies de Lauraceas, que pelo alto teor de substâncias fenólicas presentes em seus óleos essenciais, apresentam alta atividade de oxidação fenólica.

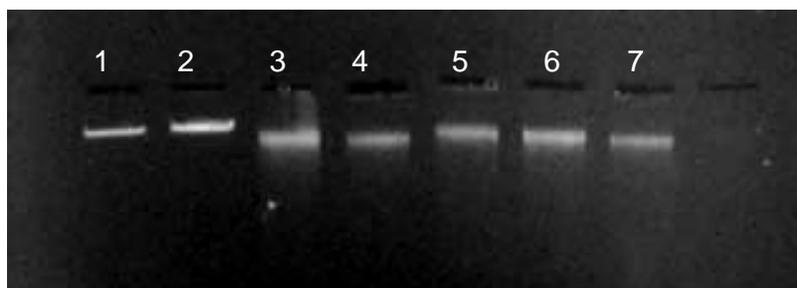


Figura 2- Visualização das bandas de DNA extraído de 5 indivíduos adultos de *Aniba rosaeodora* em gel de agarose 1%. As colunas de 1 a 2 - padrões de peso molecular do DNA do fago-lambda correspondem respectivamente à 100 e 200 ng/μl. As colunas de 3 a 7 - DNA genômico total extraído da espécie. Embora a foto mostre indivíduos de *A. rosaeodora* todas as espécies apresentaram mesmo padrão de extração.

5.2. Amplificação do DNA

Foram selecionados 7 “*primers*” para serem usados na amplificação de locos polimórficos em função do elevado número de marcas polimórficas, maior reprodutibilidade no padrão de bandejamento e maior nitidez (Tabela 1). Os números mínimo e máximo de bandas observadas, respectivamente, foram 10 (para ISSR 15) e 31 (para ISSR 9), ambos em *A. rosaeodora*, somando uma média de 20 bandas polimórficas por “*primer*”. Estes resultados caracterizam a elevada capacidade na detecção de polimorfismo por meio dessa técnica. O mesmo ocorreu em outros trabalhos (WOLFE *et al.*, 1998; RUAS *et al.*, 2003; ROSSATO *et al.*, 2007). O grau de consistência da técnica foi medido por meio da análise de duas amostras independentes de cada espécie. Todos os locos analisados estavam presentes nas duas extrações independentes, caracterizando o elevado grau de consistência da técnica de ISSR no

estudo do polimorfismo de DNA no gênero *Aniba*. Resultados semelhantes foram obtidos por YANG *et al.* (1996) em sorgo. Na figura 3 é mostrado o padrão de fragmentos gerados pelo marcador ISSR 32, em amostras de DNA de *A. canelilla* e *A. parviflora* e *A. rosaeodora*.

Tabela 1. *Primers* de ISSRs utilizados nesse estudo, suas temperaturas de anelamento e número de pares de bases.

Primer	Sequência	T° anel.	PB
ISSR 9	(AC AC AC AC AC AC AC AC)-CG	55.5	18
ISSR 12	(GACAC GACAC GACAC GACAC)	60.5	20
ISSR 15	(CA CA CA CA CA CA CA CA CA)-AG	55.5	18
ISSR 20	CCA-(CGA CGA CGA CGA CGA)	53	18
ISSR 27	GAC-(CAA CAA CAA CAA CAA)	55	18
ISSR 29	(AG AG AG AG AG AG AG AG)-GCC	54	19
ISSR 32	(GA- GA- GA- GA- GA- GA- GA- GA)-ATC	54	19

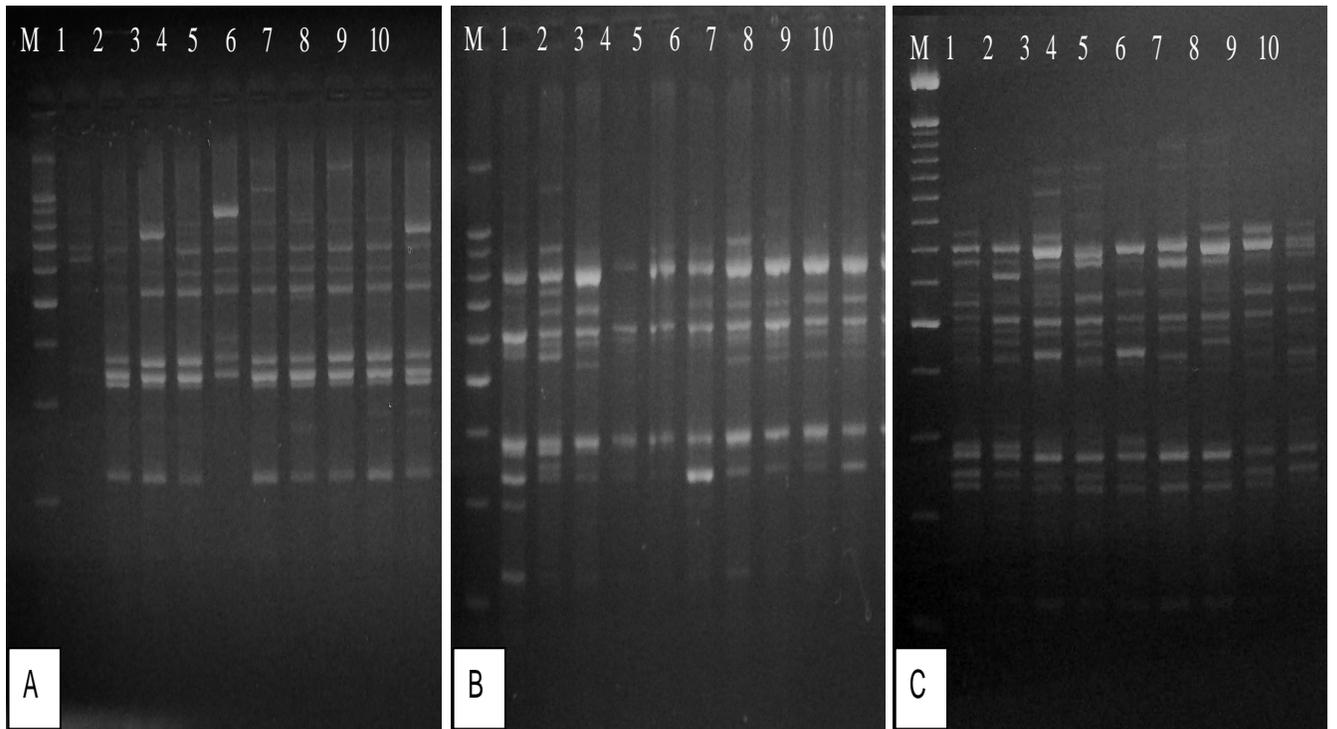


Figura 3 - Padrão de fragmentos gerados pelo marcador ISSR 32, em amostras de DNA de (a) *A. canelilla*, (b) *A. parviflora* e (c) *A. rosaeodora* De 1 a 10 = amostras e M = marcador Ladder 100pb).

5.3. Polimorfismo genético

O percentual de polimorfismo total para cada espécie pode ser observado na tabela 2. As reações de amplificação resultaram em um total de 321 bandas para as três espécies, desse total, 227 foram polimórficas o que corresponde a 86.29%. Santos *et al* (2007), utilizando marcadores RAPD também encontraram elevada porcentagem de locus polimórficos (98,04%) para espécie do gênero *Aniba*. Em comparação com marcadores co -dominantes, em geral, marcadores dominantes apresentam maiores níveis de diversidade genética (GE & SUN, 2001).

A população de *A. roseadora* apresentou o maior número de locos polimórficos com uma porcentagem de 40,50% (130 bandas), seguida de *A. canellila*, com 34,58% (111 bandas), e a população de *A. parviflora* apresentou o menor número de polimorfismo, com 32,71%, (105 bandas), todos foram testados em uma significância de 1% de probabilidade de erro. Os marcadores moleculares ISSR vêm sendo utilizados de maneira bastante eficiente na estimação da diversidade genética em níveis intra e interespecíficos (AJIBADE *et al.*, 2000; RAINA *et al.*, 2001; BORNET *et al.*, 2002).

O potencial oferecido pelos marcadores ISSR depende da variabilidade, frequência e da distância entre dos microssatélites, variando com as espécies e com os motivos SSR que são utilizados como *primers*, que podem diretamente influenciar na geração de bandas (HADIA *et al.*, 2008). Este fato pode explicar o baixo percentual de polimorfismo médio dentro das populações aqui estudadas (35,93%). É provável que um maior número de *primers* oferecesse uma informação adicional, uma vez que poderia atingir com maior abrangência o genoma das espécies do gênero *Aniba*.

Entre os *primers* selecionados, o ISSR 29 amplificou uma banda discreta e reproduzível em um comprimento de aproximadamente 530 pb, especificamente, na

espécie *A. rosaeodora*. Esta banda representa um indicativo de um possível marcador para identificação desta espécie. Um *bulk* fechado de 19 indivíduos para cada espécie foi utilizado para confirmar o aparecimento da banda (Figura 4). Um dos grandes problemas enfrentados por produtores de muda da pau-rosa (*A. rosaeodora*) visando a extração do óleo, é a identificação equivocada. O desenvolvimento de protocolos para identificação dessa espécie, com base em marcadores moleculares, se faz necessário, tanto para o manejo florestal, estruturação de plantios como para a seguridade e procedência do óleo essencial comercializado.

Tabela 2- Numero total de bandas e porcentagem de locos polimórficos entre as espécies do gênero *Aniba* analisadas.

Espécie	Total de bandas	P%
<i>Aniba rosaedora</i>	130 bandas	40,50%
<i>Aniba canellila</i>	111 bandas	34, 58%
<i>Aniba parviflora</i>	105 bandas	32,71%
Média	115,3	35,93%

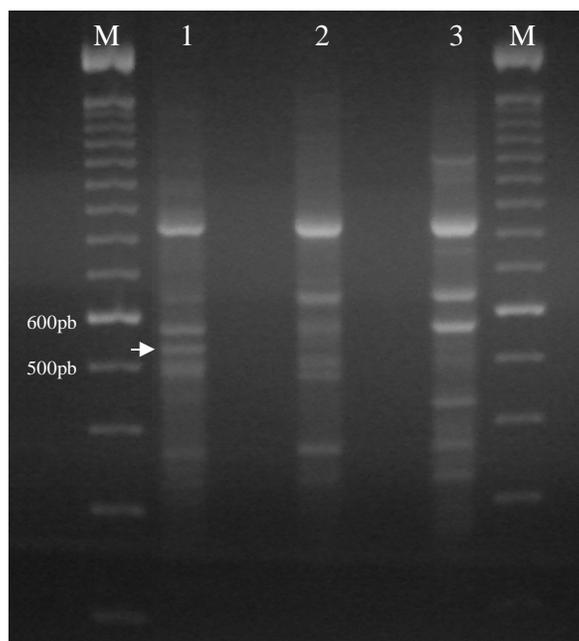


Figura 4. Perfil eletroforético de marcadores ISSR em três espécies de *Aniba*. Amostras 1 –*Aniba rosaeodora*, 2- *Aniba canellila* e 3 – *Aniba parviflora*. M= marcador ladder 100 pb, as setas indicam a banda específica em aproximadamente 530 pb.

5.4. Diversidade genética

Os valores da Diversidade de Shannon-Wiener (SHANNON & WIENER, 1949) observados para *A. rosaeodora* foi de 0.0931; para *A. canellila* foi de 0.0805 e 0.0852 para *A. parviflora* e o número de alelos observados (n_a) variou de 1.33 a 1.45 e o número de alelos efetivos (n_e) variou de 1,12 a 1,14 (Tabela 3).

A média da diversidade genética entre as espécies foi de 0.2765, este valor pode ser considerado moderado uma vez que o índice de Shannon-Wiener varia de 0 a 1 e considera que quanto mais próximo de 0 mais baixa a diversidade. Em geral, as

estimativas de diversidade genética foram inferiores ao que tem sido observado em populações de outras espécies arbóreas tropicais estudadas como o mogno, *Swietenia macrophylla* (GILLIES *et al.*, 1999; CÉSPEDES *et al.*, 2003), andiroba, *Carapa guianensis* (HALL *et al.*, 1994b), Ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* e cedro *Cedrela odorata* (MARTINS *et al.*, 2008).

A diversidade genética presente entre os indivíduos das espécies de *Aniba* estudadas está diretamente relacionada com a capacidade de dispersão das suas sementes. Espécies do gênero *Aniba* possuem dispersão do tipo zoocórica, ou seja, quando as sementes são dispersas por animais. Estes geralmente comem vários frutos de uma só vez, e depositam as sementes junto com as fezes em locais distantes, acarretando a formação de grupos de indivíduos geneticamente relacionados, o que pode ter limitado a amostragem de indivíduos mais divergentes. Em um estudo realizado por SPRIRONELLO *et al.*, 2004, avaliando o grau de dispersão dos frutos em *Aniba rosaeodora* relataram que 60% dos frutos analisados não tinham potencial para serem dispersos, por estarem infestados por larvas ou devido a abortos espontâneos, estes fatores podem estar relacionados com a baixa diversidade genética aqui encontrada para as espécies estudadas.

Outro fator que também pode influenciar na diminuição da diversidade genética dentro nas três do gênero *Aniba* estudadas, é a exploração desordenada dessas espécies que tem diminuído drasticamente suas populações naturais, aumentando assim o risco de depressão por endogamia, pois populações pequenas geralmente sofrem endogamia. Endogamia significa o acasalamento de indivíduos que são relacionados por ascendência, ou seja, diz respeito a homozigotos que possuem alelos idênticos por ascendência. Com base nos resultados gerados, uma estratégia que pode ser proposta para aumentar a diversidade genética das espécies estudadas, seria a introdução de

novos indivíduos das espécies visando o aumento da heterosigiosidade dentro das populações, contribuindo assim para o aumento da variabilidade genética e a manutenção das espécies. Outra solução mais seria é o estabelecimento de bancos ativos de germoplasma, onde as espécies seriam protegidas. Nesse caso, é necessário um manejo efetivo, o que exige conhecimento ecológico e recursos financeiros.

A compreensão dos efeitos das ações do homem sobre a biodiversidade constitui um item fundamental para o sucesso de programas de conservação florestal. A preservação da diversidade genética se tornou objetivo da maioria desses programas e conhecer a distribuição desta diversidade dentro e entre populações naturais é o primeiro passo (CAVALLARI, 2004). O conhecimento do modo como a variação genética de uma espécie está distribuída em suas populações é essencial para a sua conservação, como também, para o estabelecimento de formas de exploração econômica.

Tabela 3. Estimativas da diversidade genéticas em três espécies do gênero *Aniba* do Amazonas. n_a : número de alelos observados; n_e : número de efetivos; Percentual de locos polimórficos (P), Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (I), entre parêntese, o desvio padrão.

Espécie	n_a	n_e	I	P
<i>A. rosaeodora</i>	1.40 (0.4917)	1.14 (0.2592)	0.09 (0.1478)	40,50
<i>A. canellila</i>	1.35 (0.4764)	1.13 (0.2517)	0.08 (0.1432)	34,58
<i>A. parviflora</i>	1.32 (0.4699)	1.14 (0.2692)	0.08 (0.1522)	32,71
Média	1.36	1.13	0.28	35,93

5.5. Análise da Matriz de Similaridade

A similaridade genética entre as três espécies do gênero *Aniba* estimada por meio de marcadores ISSRs está apresentada da tabela 4 e pela figura 5, mostrando que a maior similaridade genética ocorreu entre as espécies, *A. rosaeodora* e *A. parviflora* tendo uma distância genética de 0,1041 que também é sustentado pelo resultado da Identidade Genética de Nei, (1978). Onde seus valores calculados entre pares de populações, variaram de 0,9011 entre *A. parviflora* e *A. rosaeodora*, valores estes que, por serem próximos a 1, mostram o alto grau de similaridade genética entre as espécies avaliadas (Tabela 4). Estes resultados podem auxiliar a explicar a frequente dificuldade na identificação botânica destas espécies, o que propicia a comercialização errônea de seus óleos essenciais. Trabalhos comprovam que marcadores moleculares podem auxiliar na identificação de acessos de coleções, bem como pode ser usado na classificação daqueles ainda não identificados botanicamente e, ainda, na reclassificação de alguns acessos erroneamente identificados (RAINA *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2004; ROSSATO *et al.*, 2007).

A alta similaridade genética entre essas duas espécies pode sugerir o possível surgimento de híbridos naturais. Já foram observados híbridos naturais em espécies florestais como *Acacia*, *Pinus* e *Eucalyptus*, neste último os híbridos não podem ser distinguidos dos parentais, se não por meio de genotipagem (ZOBEL *et al.*, 1987; THAM, 1976; CRITCHFIELD, 1973). A hipótese de híbridos entre *A. rosaeodora* e *A. parviflora*, pode estar relacionada com o aparecimento de ecótipos, relatado por MAY & BARATA (2004). Para confirmação de híbridos em espécies de *Aniba*, faz necessário um estudo amplo e detalhado, da biologia floral, reprodutiva e da citogenética dessas espécies.

Por outro lado os resultados indicam que a maior distância genética encontra-se entre as espécies *A. rosaeodora* e *A. canellila* tendo uma distância genética de 0,1423 que também é sustentado pelo resultado da Identidade Genética de Nei, (1978). Onde seus valores calculados entre pares de populações, variaram de 0,8673 entre *A. rosaeodora* e *A. canellila* (Tabela 4).

O resultado observado no dendrograma (Figura 6) sugere a existência de estruturação genética espacial entre as espécies, visto que indivíduos próximos tendem a apresentar menor distância entre si do que de indivíduos distantes. Na natureza, as plantas em uma população apresentam geralmente estruturas agregadas ou em grupos de indivíduos, que geralmente são geneticamente aparentados (HUTCHINGS, 1986). Em termos de melhoramento, isso indica a necessidade de diversificar a coleção, buscando coletar materiais silvestres e em outras regiões com maior diversidade do gênero, dados esses que seriam teoricamente mais divergentes (TOQUICA *et al.*, 2003). Sendo assim, a seleção deve priorizar indivíduos mais divergentes a fim de procurar explorar a heterose, ou vigor híbrido. Tendo em vista que o dendrograma foi construído com base em marcas genéticas de herança dominante e supostamente neutra, não é possível garantir que os cruzamentos de indivíduos, localizados em grupos divergentes, expressaram heterose.

Alguns indivíduos de *A. canellila*, *A. parviflora* e *A. rosaeodora* não formaram um agrupamento exatamente coeso, sugerindo possível erro na identificação no momento da coleta ou na manipulação no laboratório. A confirmação da origem do não agrupamento será possível com a re-extração do material coletado que será feita posteriormente.

Tabela 4. Estimativa da distância genética de Nei, (1978) diagonal inferior e valores de Identidade genética de Nei, (1978) diagonal superior, para A- *A. rosaeodora*, B- *A. canellila* e C- *A. parviflora*.

Espécies	A	B	C
A	***	0.89	0.90
B	0.11	***	0.87
C	0.10	0.14	***

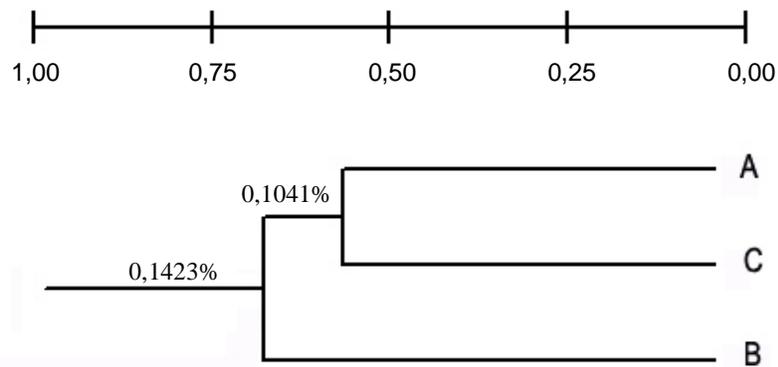


Figura 5. Dendrograma das espécies analisadas: A- *A. rosaeodora* , B - *A. canellila*, C- *A. parviflora*.

Método de agrupamento: Ligação entre grupos (UPGMA)

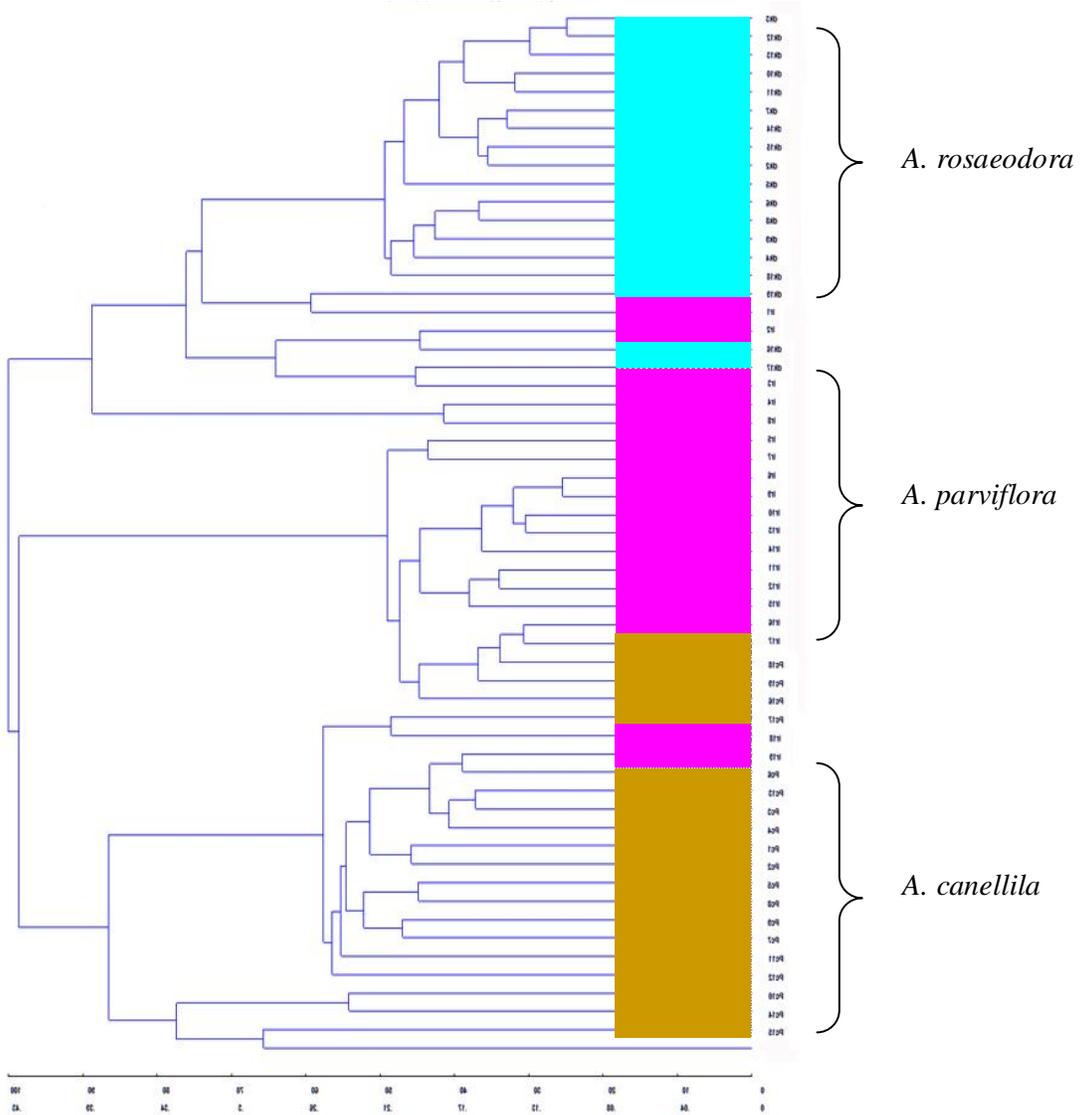


Figura 6. Dendrograma de similaridade genética entre as espécies de *Aniba*, baseado no Coeficiente de Jaccard, mostrando a formação dos grupos.

O estudo de diversidade genética entre as espécies do gênero *Aniba* é essencial para o entendimento da estrutura genética dessas espécies, podendo fornecer um melhor delineamento de estratégias de conservação e manejo, bem como, para o estabelecimento de formas de exploração econômica. Desta forma, a informação gerada sobre a similaridade ou divergência genética de indivíduos pode ser de grande valor, especialmente se o objetivo do estudo for o melhoramento genético. Além disso, os resultados gerados por esta análise podem também ser incluídos em programas de conservação genética tanto *in situ* quanto *ex situ*, uma vez que mostra se há a existência de moderada diversidade genética dentro das espécies.

6. Conclusões

- As modificações propostas para o método de obtenção de ácidos nucléicos CTAB, foram eficientes para as espécies de *Aniba* analisadas.
- O índice de diversidade genética entre as espécies de *Aniba* foi considerado moderado.
- Alta similaridade genética entre as espécies *A. rosaeodora* e *A. parviflora*.

7. Referencias Bibliográficas

- Ajibade, S.R.; Weeden, N.F.; Chite, S.M. 2000. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111:47–55.
- Almeida, E. R. 1993. *Plantas medicinais brasileiras*. Hemus, 341 pp.
- Alvarenga, M. A. DE.; Brocksom, U.; Castro, C. O.; Gottlieb, O. R.; Magalhães, M. T. 1977. Neolignans from *Aniba burchelli*. *Phytochemistry*, 16:1797 – 1799.
- Alencar, J.C and Fernandes, N.P.1978. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies. Rosewood (*Aniba duckei* Kostermans). *Acta Amazônica*, 8:523-541.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers: natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall. 511 pp.
- Barth, S.; Melchinger, A.E.; Lübberstedt, T.H. 2002. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 11: 495-505.
- Bornet, B and Branchard, M. 2004. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related Brassica taxa and *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas*. 140: 245-248.
- Bornet, B., Muller, C., Paulus, F., Branchard, M. (2002) Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetranucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). *Genome*, 45:890–896.
- Caixeta, E.T; Oliveira, A. C. B de; Brito, G. G; Sakiyama, N. S. 2006. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A; Caixeta, E. (Ed). *Marcadores Moleculares*.Viçosa,UFV,9-78.

- Cavallari, M. M.; Forzza, R.C.; Veasey, E.A.; Zuchi, M.I.; Oliveira, G.C.X.O. 2006.. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaco, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation*, 15:4357-4373.
- Céspedes, M.; Gutierrez, M.V.; Holbrook, N.M. & Rocha, O.J. 2003. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. *Molecular Ecology*.12: 3201-3212.
- Chanderbali, A.S. 2004. Lauraceae: *Endlicheria*. *Flora Neotropica*, Monograph 91. New York, New York Botanical Garden.
- Chase MW and Hills H.H.1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Táxon*, 40: 215–220.
- Ciampi, A.Y. & Grattapaglia, D. 2001. Variabilidade genética em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Caesalpiniaceae) estimada com polimorfismos de AFLP, microssatélites e seqüenciamento de cpDNA. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 12:1-32.
- Clay, J. W.; Sampaio, P. T. B; Clement, C. R. 1999. *Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/SEBRAE, Manaus, Amazonas. 409pp.
- Conte R.; Reis. M. S. dos.; Mantovani, A and Vencovsky, R. .2008. Genetic Structure and Mating System of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A Comparative Analysis Using Microsatellite and Allozyme Markers. *Journal of Heredity*,10:1-7.
- Contim, L. A. S.; Carvalho,C. R.; Martins, F. A.; Freitas,D. V.2005. Nuclear DNA content and karyotype of Rosewood (*Aniba rosaeodora*).*Genetics Molecular Biology*, 4:754-757.

- Correa, P.M. 1984. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 55pp.
- Costa, L. G. S.; Ohashi, S. T.; Daniel, O. 1995. *O pau-rosa* -Aniba roseodora, Ducke. Ministério da Educação e do Desporto, Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém, Pará. 15 pp.
- Cruz, C.D. 2006: Programa Genes: Programa para análise e Processamento de Dados. Baseado em Modelos de genética Quantitativa e Estatística Experimental. Viçosa: UFV, versão 2007.00. 32pp.
- Dias, L.A.S. 1998. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins -Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, Cap.9, 405-476.
- Doyle J. J, Doyle J. L .1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*,19: 11–15.
- Eira, Mirian T. S.; Reis, Raimunda, B. 2004. Recursos Genéticos – Conservação de Sementes de Café. Disponível em: [HTTP://www.giacometti.org.br/html/artigo_exibe_impressao.cfm?Id=102#](http://www.giacometti.org.br/html/artigo_exibe_impressao.cfm?Id=102#). acesso em 18 ago.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. Arlequin ver. 3.1. 2005: an integrated software package for population genetics data analysis. Berne: University of Berne. 32pp.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1995. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, 220pp.
- Ferreira, M. E. ; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ed. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, 220pp.
- Frankel, O. H.; Brown, H. D.; Burdon, J. J. 1998. *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge: University Press, 1998. 299 pp.

- Ge, X. J. and Sun. M. 2001. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. *Wetlands Ecology and Management*, 9:203-209.
- Gillies, A.C.M.; Navarro, C.; Lowell, A.J.; Hernández, M.; Wilson, J.; Cornelius, J.P.1999a. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPD. *Heredity*,83: 722-732.
- Gottlieb, O. R. 1972. Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, 11: 1537 – 1570.
- Gottlieb, O. R. & Kubitzki, K. 1981. Chemogeography of Aniba. *Plant Systematics and Evolution*,4:281-289.
- Gottlieb, O. R; Koketsu, M; Magalhães, M.T; Maia, J. G. S; Mendes, P.H; Rocha, A. I. da; Wilberg, V. C. 1981. Óleos essenciais da Amazônia. VII. *Acta Amazônica*,11, 143-148.
- Gupta, M.; Chuyi, Y.S.; Romero-Serverson, J.L.; Owen, J.L.1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using Simple-Sequence Repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89:998-1006.
- Gusson, E.; Sebbenn, A. M.; Kageyama, P. Y. 2005. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. *Scientia Forestalis* (IPEF), 67:123-135.
- Hadia, H.A.; El-Mokadem, H.E.; El-Tayeb, H. F. 2008. Phylogenetic relationship of four *Ficus* species using amplified polymorphic DNA (RAPD) and Inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. *Journal of Applied Sciences Research*, 5:505-514p.

- Hall, P; Chase, M.R. and Bawa, K.S. 1994a. Low genetic variation but high population differentiation in a common tropical forest tree species. *Conservation Biology*. 8: 471-482.
- Huang, J and Sun, S. M. 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potatoes and its wild relative in *Ipomoea* series Batata (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR) and restriction analysis on chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1050-1060.
- Hussain, A.J.; Gupta, V.; Ali, J.; Ranjekar, P. K.; Sidding, E. A. 2000. Physiological characterization, genetics and molecular mapping of a new source of temperature sensitive genetic male sterility in rice. Fourth International Rice genetic Symposium, *Philippines Abstract*, 22-27.
- Hutchings, M.J.1986. The structure of plant populations. In: Crawley, M.J. (Ed) Plant ecology. London: Blackwell.
- Jardim de Vargas, R. C.; Oliveira, A. C.; Carvalho, F. I. F.; Zimmer, P. D.; Kopp, M. M.; Freitas, F. A.; Bernardi, E. C. 2006. Dissimilaridade genética entre populações de azevém anual do Rio Grande do Sul. Pelotas. *Revista Brasileira de Agrociências*, 12: 133-138.
- Kageyama, P. Y.; Sebbenn, A. M.; Ribas, L. A.; Gandara, F. B.; Castellen, M.; Percim, M. B.; Venkovsky, R. 2003. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. Piracicaba. *Scientia Forestalis*, 64:93-107.
- Kim C.S.; Lee C.H.; Shin J.S.; Shung, Y.S.; Hyung, N.I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Researches*, 25: 1085-1086.

- Kimura M & Crow J F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49:725-38,
- Lacerda, D.R., Acedo, M.D.P, Lemos Filho, J.P. e Lovato, M.B. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology*, 5:1143-1152.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolution Biology*, 6:381-398.
- Li, Ang and Ge, S. 2001. Genetic Variation and Clonal Diversity of *Pasmochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR Markers, *Annals of Botany*, 87:585-590.
- Lima, M da P.; Silva, T. M. da.; Silva, J. D. da.; Zoghbi, M das G . B, Andrade, E H A. 2004. Essential oil composition of leaf and fine stem of Aniba canelilla (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. *Acta Amazonica*. v(34):329 – 330.
- Mabberley, D.J. 1990. *The plant book*. Cambridge University Press, New York.
- Marcato, A. C.; Pirani, J. R. 2005. Revision of *Butia* (Becc.) Becc. (Butiinae, Cocoeae, Palmae). In: XVII International Botanical Congress, Viena. XVII International Botanical Congress, *Abstracts*, 387.
- Marques, C.A. 2001. Importancia economica da familia Lauraceae Lindl. *Revista Floresta e Ambiente*, 8: 195-206.
- Martim, J.P.; Sanchez-Yelamo, M.D. 2000. Genetic relationships among species of the genus *Diploaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeats markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 1234-1241.
- Martins, E. C. 1989. *Plantas medicinais de uso na Amazônia*, 2th ed., raficentro/Cejup, Belém, 107 pp.
- Martins, K.; Dos Santos. J. D.; Gaiotto . F. A; Moreno, M. A.; Kageyama, P.Y 2008. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae –

- Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 31: 20-35.
- Matioli, S.R. 2001. *Biologia molecular e evolução [Molecular Biology and Evolution]*. *Holos editora*. 185pp
- May, P. H. and Barata, L. E. S. 2004. Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: Options for sustainable production. *Economic Botany*, 2: 257-265.
- McDermott, J. M.; McDonald, B. A. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review Phytopathology*, 31:353-373.
- Miller, M.P. 1997. TFPGA – Tools for Population Genetic Analyses: A Windows® program for the analyses of allozymes and molecular population genetic data. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University.
- Moraes, A. A. de.; Rezende; C. M. A da M.; Bülow, M. V. V.; Mourão, J. C.; Gottlieb, O. R.; Marx, M. C.; Rocha, A. I. DA.; Magalhães, M. T. 1972. Óleos essenciais de espécies do gênero *Aniba*. *Acta Amazonica*, 2:41 – 44.
- Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S. de.; Valadares-Inglis, M. C. 2001. *Recursos Genéticos & Melhoramento – Plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 1183pp.
- Naves, Y. R.; Gottlieb, O. R.; Magalhães, M. T. 1961. Sur l' huile essentielle d' *Ocotea teleiandra*. *Helv. Chemistry. Acta*, 44:1121 – 1123.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei, M; Naruya, S. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

- O'Brien, S. J.; Evermann, J. F. 1988. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. London, *Trends in Ecology and Evolution*, 3: 254-259 .
- Ohashi, S.T.; Rosa, L.S.; Santana, J.A. 1997. Brazilian rosewood oil: sustainable production and oil quality management. *Perfumer & Flavorist*, 22: 1-5.
- Padmalatha K, Prasad MNV (2006). Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of select medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology*, 5: 230-234.
- Palomera-Avalos, V.; Castro-Félix.; P and Villalobos-Arámula.R. A. 2008. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*). *African Journal of Biotechnology*, 7:051-054.
- Pinto, S. I. C.; Souza, A. M.; Carvalho, 2004. D. Genetic variability by isozymes in populations of *Copaiba langsdorffii* desf. in two fragments of riparian forest. Piracicaba, *Scientia Forestalis*, 65, 40-48.
- Raina, S.N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K.P., Devarumath, R.M. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44:763-772.
- Ramp, J. M.; Collinge, S. K.; Ramker, T. A. 2006. Restoration genetics of the vernal pool endemic *Laslhenia conjugens* (Astereaceae). *Conservation Genetic*, 5:631-649.
- Ratnaparkhe, M. B.; Tekeoglu, M.; Muehlbauer, F.J .1998. Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) polymorphisms are useful for finding marks associated with disease gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics*, 7:515-519.

- Reddy, M. P; Sarla, N. E; Sidding, E. A. 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphisms and its applications in plant breeding. *Euphytica*, 128:9-17.
- Reis, A.M.M.; Grattapaglia, D. 2004. RAPD variation in a germplasm collection of *Myracrodruon urundeuva*(Anacardiaceae), an endangered tropical tree: recommendations for conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 529-538p.
- Rohwer, J.G. 2000. "Toward a phylogenetic classification of the Lauraceae: evidence from matK sequences". *Systematic Botany*, 25: 60–71p.
- Rossato, M; Barbieri, R. L; Schäfer, A; Zacaria, J. 2007. Caracterização molecular de populações de palmeiras do gênero *Butia* do rio grande do sul através de marcadores ISSR. *Magistra*, 19:311-318p.
- Ruas, M. P.; Ruas, C.F.; Rampim, L.; Carvalho, V.P.; Ruas, E.A.; Sara, T.2003. Genetic relationship in *Coffea* and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter- Simple Sequence Repeats) markers. *Genetics Molecular Biology*, 3:319-327p.
- Santos, R. P.; Angelo, P. C. S.; Quisen, R. C.; Oliveira, C. L.; Sampaio, P. T. B. 2007. RAPD em Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): adaptação do método para coleta de amostras *in situ*, ajuste das condições de PCR e apresentação de um processo para selecionar bandas reprodutíveis. *Acta Amazonica*, 37: 253-260p.
- Sebbenn, A. M. 2002. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamento com espécies nativas. São Paulo. *Revista do Instituto Florestal*, 14: 115-132p.
- Silvertown, J. W.; Doust, J. L. 1993. *Introduction to plant population biology*. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 210 pp.
- Singh, A. P.; Dwivedi, S.; bharti, S.; Srivastava, A.; Sing, V.; Khanuja, S.P.S. 2004. Phylogenetic relationship in *Ocimum* reveled by RAPD markes. *Euphytica*, 136: 11-20.

- Shannon C.E and Weaver W .1949. The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Souza, A. M. de.;Carvalho, D de .;Vieira, F de A.; Nascimento. L H do.; Lima., D. C. de. 2007. Estrutura genética e espacial de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. em mata de galeria. *Cerne*,13:239-247.
- Souza, J.C. de. 2000. Variabilidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 86pp.
- Spironello, W.R.; Sampaio, P. T. B.; Vieira, G.; Barbosa, A.P. 2003. Ecologia reprodutiva do Pau-rosa (*Aniba resaeodora* Ducke, lauraceae) em uma mata de terra firme na Amazônia. In: HIGUCH, N.; SANTOS, J.;SAMPAIO, P.T.B.; MARENCO, R.A.;FERRAZ, J.; SALES,P. C.; SAITO, M.; MATSUMOTO,S. (orgs). Projeto Jacarandá Fase II: Pesquisas florestais na Amazônia Central. Manaus; INPA, p 69-88.
- Telles, M. 2000. Diversidade genética e estrutura genética populacional de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) do Sudeste de Goiás. Goiânia. Dissertação (Mestrado) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 129 pp.
- Toquica, S.P.; Rodriguez, F.; Mertinéz, E.; Duque, M.C.; Thomé,J. 2003. Molecular characterization by AFLP of *Capsicum* germoplasm from Amazon Department Columbia . *Genetic Resouce and Crop Evolution*, v(50):639-647.
- Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Giulietti, A.M. and Melhem, T.S. 2003. Flora fanerogamica do Estado de Sao Paulo – volume 3. RiMa/Fapesp. Sao Paulo.
- Wang, G.; Machalingan, R.E.; Knap, H. T.1998. (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ISSRs) generate polymorphism en soybean. *Glycine max* (L) Merr. *Thoretical and Apllied Genetics*, 96:1086-1096.

- Wesing, K.; Nybom, H. Wolff, K.; Khal, G.; 2004. DNA fingerprint in plant. Boca Raton, USA, 322p
- Wolfe, A.D.; Xiang, Q.; Kephart, S.R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scropholariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology*, 7:1107-1125p.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15:395-420.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations. Chicago: *University of Chicago Press*, 4: 423.
- Wu, K.; Jones, R.; Danneberger, L.; Scolnik, P.A. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acid Research*, 22:3257-3258.
- Yang, W., A.C. de Oliveira, I. Godwin, K. Schertz & J.L. Bennetzen. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in chinese sorghums. *Crop Science*, 36: 1669- 1676.
- Yeh, F.C.; Boyle, T.Y.Z.; Xian, J.M. 1997. POPGENE version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176–183.
- Zucchi, M. I.; Pinheiro, J. B.; Chaves, L. J.; Coelho, A. S. G., Couto, M. A, Morais, L. K. de and Vencovsky, R. 2005. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 40:975-980.